

不同碳氮比对有机肥发酵过程中微生物数量的影响

耿富卿¹ 苟剑渝² 何 楷² 张纪利² 李章海³ 江玉平³

(1.广西中烟工业有限责任公司,南宁 530001;2.遵义市烟草公司正安县分公司,贵州正安 563401;
3.中国科学技术大学,合肥 230052)

摘要:通过不同碳氮比对有机肥发酵过程中微生物的影响研究,以寻求有机肥发酵最佳碳氮比。结果表明:不同碳氮比处理真菌、霉菌、大肠杆菌、蛔虫卵的数量均随时间的推移而减少;发酵完成后以 25:1 的处理分离到的真菌和细菌数量均较多,分离到的霉菌、蛔虫卵数最少;C/N 比以 25:1 最有利于有机肥的发酵。

关键词:碳氮比;发酵过程;微生物

有机肥物料发酵是一系列微生物活动的复杂过程,包含着有机肥物料的分解与合成^[1]。有机肥发酵过程中每个阶段不同微生物(主要包括细菌、真菌)均发挥着重要作用。发酵初期,有机肥堆体温度的上升由嗜温微生物起作用,当嗜温微生物的活动使有机肥的温度达到一定温度的时候,嗜热微生物取代嗜温微生物而使有机肥的堆体温度保持在一定程度,当有机物中的养分分解不能满足嗜热微生物的要求后,嗜热微生物逐渐减少重新被嗜温微生物取代,温度也跟着下降,此间达到杀灭病原菌的目的^[2-7]。不同的碳氮比条件下,不同种类微生物的数量不同,因此,本文通过研究不同微生物的变化以寻求适合烟草专用有机肥发酵的最适碳氮比。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2011 年 12 月中旬至 2012 年 3 月中旬在贵州省遵义市正安县谢坝乡有机肥研发工场进行。取当地丰富的玉米秸秆和牛粪资源,按

照不同 C/N 比掺配用于有机肥发酵。玉米秸秆含 C 量为 46.31%、含 N 量为 0.53%;牛粪(风干)含 C 量为 34.16%、含 N 量为 1.78%。

1.2 试验方法

试验设 20:1、25:1、30:1 和 35:1 四个 C/N 比处理,玉米秸秆和牛粪用量如表 1,含氮量不足时用尿素补足。采用条垛型有氧发酵方式堆积,条垛底部中间设有宽度 20cm、深度 10cm 的通风槽。按物料体积分层堆积成条垛,共分 5 层,每个处理物料总干重为 1000kg,堆垛下宽约 180cm,上宽约 90cm,高度约 90cm,长度根据物料量确定。每层之间洒上有机物料腐熟剂,用量为 200g/1000kg 湿物料,堆积后盖塑料膜防雨保温。

发酵过程中共翻堆 3 次,第 1 次翻堆在堆制 10 天左右进行,第 2 次翻堆在第 1 次翻堆后 20 天左右进行,第 3 次翻堆在第 2 次翻堆后 20 天左右进行。物料初始水分以物料湿润为宜,第 1 次翻堆补足水分 65%,以后不再补充水分。

表 1 不同 C/N 比试验设计

C/N 比处理	20:1	25:1	30:1	35:1
玉米秆(kg.干重)	500	600	700	800
牛粪(kg.干重)	500	400	300	200

1.3 检测取样

分别于第 1、2、3 次翻堆和成品装袋时取样,共取 4 次。取样时将从堆垛前中后和上中下取的样拌匀后用四分法取样,在 4℃ 下保管用于微生物检测。

1.4 微生物数量检测 (采用平板计数法测定)

用 PDA 培养基分离真菌;用营养琼脂培养基分离细菌;用高氏 (Gause) 1 号培养基分离放线菌。

(1) 系列稀释:称取样品 10g (精确到 0.01g),加入带玻璃珠的 100mL 无菌水中,静置 20min,在旋转式摇床上 200r/min 充分振荡 30min,即成母液菌悬液 (基础液)。用无菌移液管分别吸取 5.0ml 上述母液菌悬液,加入 45ml 无菌水,按 10n 系列稀释,依次得到 10-1、10-2、10-3、10-4、10-5、10-6 稀释倍数的菌悬液。

(2) 加样及培养:每个样品取 3 个连续适宜的稀释度,分别吸取不同稀释度菌悬液 0.1ml,加至预先制备好的固体培养基平板上,用涂布棒在培养基表面将菌液来回推散涂抹均匀。每一稀释度重复 3 次,于适宜的条件下培养。

(3) 菌落计数:细菌培养 24h 后计数,真菌、放线菌、霉菌培养 72h 后计数。以出现 20~300 个菌落数的稀释度的平板为计数标准,统计有效活菌数目。

1.5 大肠杆菌数量检测 (采用平板计数法测定)

采用 Aliz-gal 琼脂培养基分离大肠杆菌。

(1) 取 5g 样品,加于含 45ml 生理盐水的三

角瓶内 (瓶内预置适当数量的玻璃珠),充分振摇 20min,配成 1:10 稀释液。

(2) 用无菌移液管分别吸取 1.0ml 上述 1:10 稀释液,加入 9ml 无菌水,按 10n 进行系列稀释,依次得到 10-2、10-3、10-4 稀释倍数的菌悬液。

(3) 加样及培养:每个样品取 2 个连续适宜的稀释度,分别吸取不同稀释度菌悬液 0.1ml,加至预先制备好的 Aliz-gal 琼脂培养基平板上,用涂布棒在培养基表面将菌液来回推散涂抹均匀。每一稀释度重复 3 次,置于 37℃±1℃ 培养箱中培养。

(4) 菌落计数:待样品培养 18~24h 后,取出平板,计数紫色 (或红色) 菌落。

1.6 蛔虫卵数量检测 (改良饱和硝酸钠漂浮法)

(1) 取回样品,剔除杂物,压碎样品中的大颗粒;先后用孔径 3mm 的铜筛和孔径为 2mm 的铜筛过筛,收集过筛后的土样;

(2) 取 2 支 50 毫升大离心管,各放入过筛后的土样 5g,加 5% 氢氧化钠溶液至 40 或 45ml 刻度线;

(3) 充分混合,离心,每分钟 2000 转,离心 4 分钟;

(4) 倾去上部的氢氧化钠 (即弃去上部碱性溶液);

(5) 加入饱和硝酸钠溶液搅拌均匀,每分钟 2000 转,离心 4 分钟;

(6) 离心后,再加饱和硝酸钠溶液满至管口,覆上 18 mm×18 mm 盖玻片;

(7) 静置 15min 后,取下盖玻片置于载玻片上镜检。

2 结果与分析

2.1 不同 C/N 比处理发酵过程中真菌数量变化

由图 1 可知,各处理 4 次取样分离到的真菌

数量均随时间推移逐渐减少;C/N 比为 25:1 和 35:1 处理 4 次取样分离到的真菌数量明显高于 20:1 和 30:1 处理,其中;C/N 为 25:1 处理在发酵后 120d 时真菌数量明显高于其他处理。这可

能是由于 C/N 比为 25:1 和 35:1 的处理能较好地满足发酵过程中真菌的生长繁殖,避免了发酵过程中真菌菌体的衰老以及自溶现象的发生。

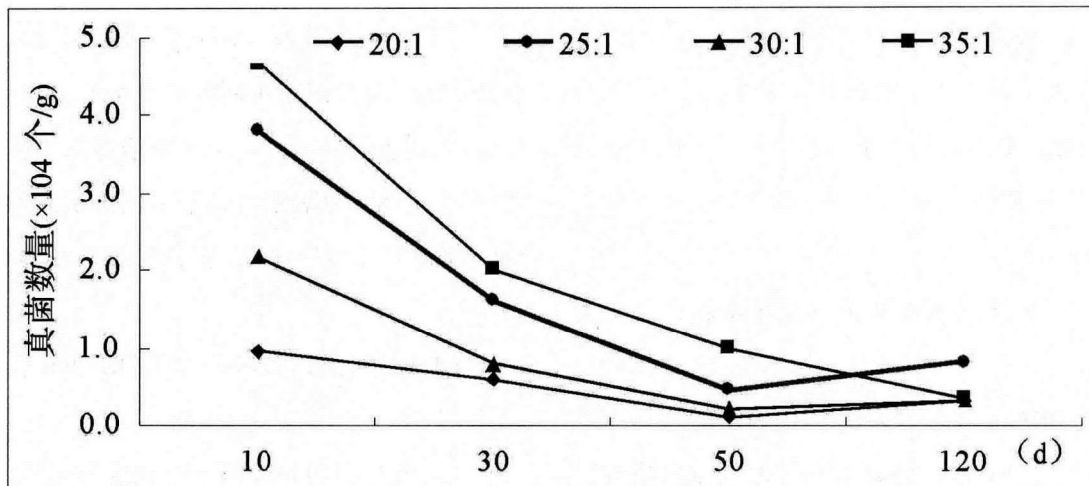


图 1 不同 C/N 比发酵处理真菌数量变化

2.2 不同 C/N 比处理发酵过程中细菌数量变化

由图 2 可知,C/N 比为 25:1、30:1 和 35:1 的 3 个处理 4 次取样分离到的细菌数量变化总体趋势均为先下降后上升,C/N 比为 20:1 的 4 次取样分离到的细菌数量变化总体趋势则为先上升后

下降。其中,C/N 比为 25:1 的处理 4 次取样分离到的细菌数量均较多,且发酵结束取样分离到的细菌数量有明显的上升。究其原因,可能是 C/N 比为 25:1 有利于堆肥中的细菌生长和繁殖,细菌进入了 2 次生长,菌群生长较为旺盛,到发酵末期分离到的细菌数量有显著回升。

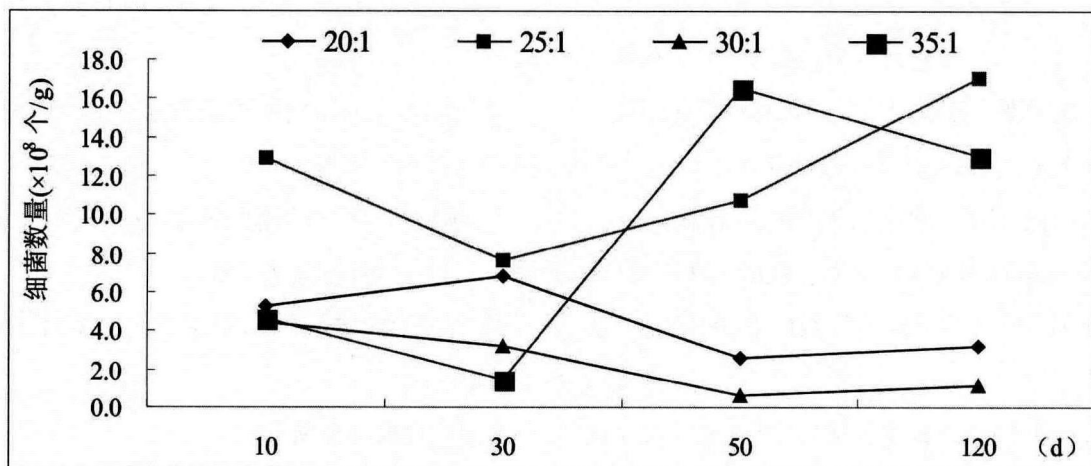


图 2 不同 C/N 比发酵处理细菌数量变化

2.3 不同 C/N 比处理发酵过程中霉菌数量变化

由图 3 可知,4 个处理 4 次取样分离到的霉菌数量变化总体趋势均为依次下降。相对其它处理来说,C/N 比为 25:1 和 30:1 处理在发酵过程

中分离到霉菌的数量较少,但第四次取样(120d)各处理分离到的霉菌数量均较少,C/N 比为 25:1 仅为 0.0060×10^4 个/克。因此,堆制时间对控制霉菌数量非常重要。

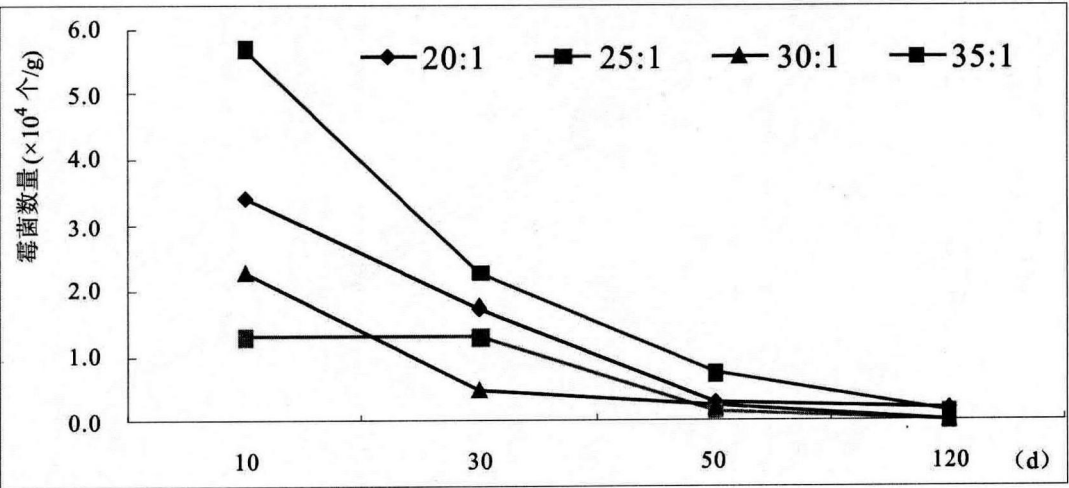


图 3 不同 C/N 比发酵处理霉菌数量变化

2.4 不同 C/N 比处理发酵过程中大肠杆菌数量变化

由图 4 可知,不同处理 4 次取样分离到的大肠杆菌数量变化总体趋势均为依次下降。相对其它处理来说,前 3 次取样 C/N 比为 20:1 和 30:1

两个处理在发酵过程中分离到的大肠杆菌数量相对较少,但第 4 次取样时 C/N 比为 25:1 和 35:1 处理分离到的大肠杆菌数量相对较少,分别为 0.014×10^4 个/克和 0.004×10^4 个/克。因此,堆制时间对控制大肠杆菌数量非常重要。

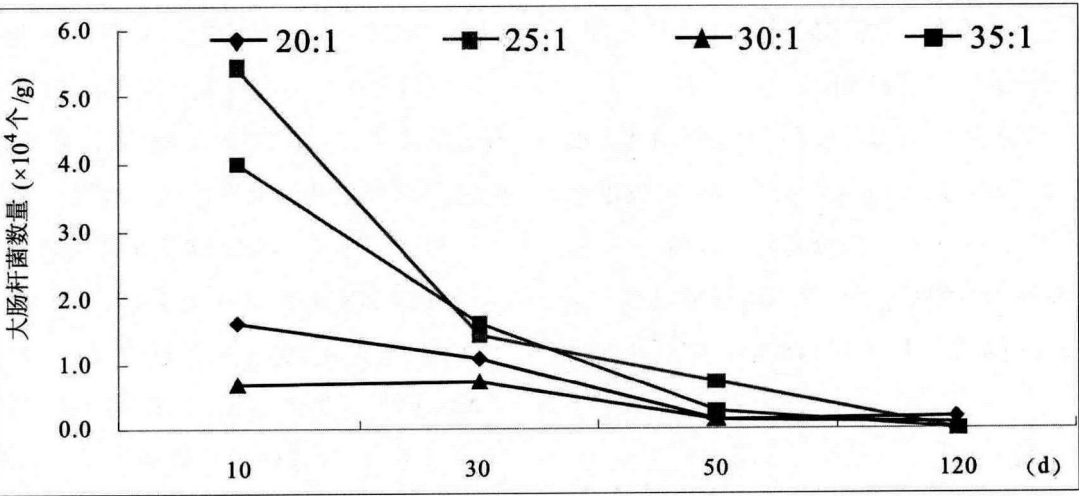


图 4 不同 C/N 比发酵处理大肠杆菌数量变化

2.5 不同 C/N 比处理发酵过程中蛔虫卵数量变化

由图 5 可知,不同 C/N 比 4 个处理 4 次取样检测到的蛔虫卵数量变化总体趋势均为依次下

降,且 4 个处理每次检测到的蛔虫卵数量差别很小,发酵结束 4 个处理每 100g 样品中蛔虫卵数量仅为 10~12 个。说明堆制时间对控制蛔虫卵数量也非常重要。

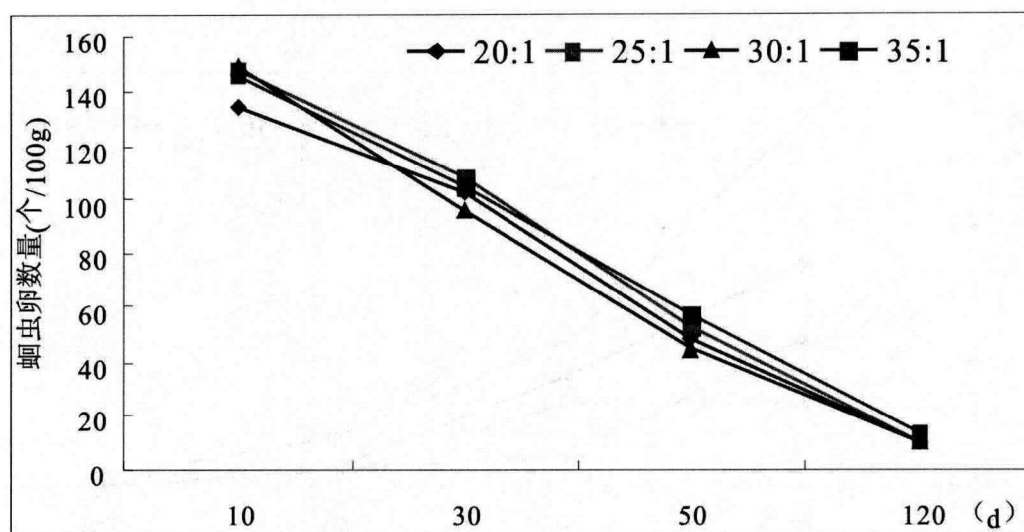


图 5 不同 C/N 比发酵处理蛔虫卵数量变化

3 结论

3.1 研究表明,各处理分离到的真菌数量均随时间推移逐渐减少,25:1 和 35:1 处理 4 次取样分离到的真菌数量明显高于 20:1 和 30:1 处理。C/N 比为 25:1、30:1 和 35:1 的 3 个处理 4 次取样分离到的细菌数量呈先下降后上升的趋势, C/N 比为 20:1 的 4 次取样分离到的细菌数量变化则先上升后下降。发酵完成后以 25:1 的处理 4 次取样分离到的真菌和细菌数量均较多,

3.2 研究表明,各处理霉菌、大肠杆菌和蛔虫卵的数量随着堆制时间的推移逐渐减少,发酵结束后以 25:1 和 35:1 处理分离到的霉菌、大肠杆菌和蛔虫卵数量相对较少。发酵完成后以 C/N 比 25:1 的处理 4 次取样分离到霉菌、蛔虫卵数最少。

4 讨论

畜禽粪便中含有大量的病原微生物、寄生虫和虫卵。未经处理的畜禽粪便或添加了畜禽粪便

而未腐熟的有机肥施到田间后,其中的致病微生物、寄生虫和虫卵可能随流水流入附近的灌溉或饮用水源,造成水源污染,间接危害人和畜禽的健康。大肠杆菌是寄居在温血动物肠道内的致病菌,大肠杆菌的病原性菌种对人类和动物健康构成了严重的危害(如引起食物中毒、腹泻等疾病,甚至导致死亡)。因此,在有机肥发酵中,将蛔虫卵死亡率以及大肠杆菌数量均作为检测指标。

发酵升温阶段主要是细菌在起作用,当达到高温阶段时,细菌数量逐渐减少,真菌数量增加,此时真菌和细菌的共同作用对温度的维持其主要作用,降温阶段真菌减少细菌开始增加。实验结果表明:C/N 比为 25:1 时最有利于有机肥的发酵^[5]。有害生物(霉菌、大肠杆菌、蛔虫卵)控制与发酵时间呈显著负相关,发酵时间越长,有害生物量越低^[8],所有处理均以最后一次(发酵 120 天)取样检测有害生物量最低,符合 NY525-2002 标准。

参考文献:

- [1]王剑飞.城市污泥微氧堆肥资源化处理处置技术研究[D].东南大学,2008.
- [2]边文骅,董敬华.用畜禽粪便生产无公害有机肥质量控制的研究[J].河北工业科技,2004,21(3):20-23,61.
- [3]黄得扬,陆文静,王洪涛.有机固体废物堆肥化处理的微生物学机理研究[J].环境污染治理技术与设备,2004.5(1):12-18,71.
- [4]边文骅.腐殖酸形成的微生物学机理研究概况[J].河北师范大学学报(自然科学版),2000,24(4):526-529.
- [5]黄国锋,吴启堂,黄焕忠.有机固体废弃物好氧高温堆肥化处理技术[J].中国生态农业学报,2003,11(1):159-161.
- [6]胡家俊,周群英.《环境工程微生物学》[M],北京:高等教育出版社,1988.
- [7]Chefetz B,P G Hateher,Y Hadax and Y Chen,Chemical and biological characterization of Organic mater during composting of municipal solid waste J Environ. Qual. 1996,25:776-78.
- [8]尹永强,何明雄,韦峰宇,等.堆肥腐熟机理研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(23):10053-10055,10058.

基金项目:贵州省烟草公司遵义市公司科技项目(合同号:2011-10)

作者简介:耿富卿(1981-),男,本科,助理农艺师,E-mail:gaotian_11@163.com